Test CEDIA® Benzodiazépines



IVD **Pour Usage Diagnostique In Vitro**

REF 10016409 (3 x 17 mL Indiko Kit)
100085 (Coffret de 3 x 17 mL)
100094 (Coffret de 65 mL)
1775561 (Coffret de 495 mL)

Application

Le test CEDIA® Benzodiazépines est un dispositif médical de diagnostic in vitro permettant le dosage qualitatif et semi-quantitatif des benzodiazépines dans l'urine humaine.

Ce test ne fournit qu'un résultat préliminaire. Il est nécessaire de confirmer les résultats analytiques obtenus à l'aide d'une méthode chimique alternative de diagnostic plus spécifique. Utiliser alors de préférence la chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CG/SM).[1] Les résultats de ce test doivent être interprétés en tenant compte du tableau clinique et de l'avis d'un professionnel avant de conclure à l'utilisation d'une drogue toxicomanogène, en particulier si des résultats positifs préliminaires sont utilisés.

Résumé et description du test

Les benzodiazépines appartiennent à une large classe de dépresseurs du SNC, connue sous le nom de sédatifs-hypnotiques.[2] Elles sont prescrits en tant qu'anxiolytiques, somnifères, anticonvulsivants, myorelaxants; ells sont également souvent utilisées en tant que préanesthésiques, ainsi que pour compléter, provoquer et maintenir l'anesthésie.[2,3,4]

Bien qu'elles soient très souvent prescrites en tant que médicaments, les benzodiazépines sont également prises en tant que drogues toxicomanogènes.[3-5] La prise chronique de benzodiazépines peut engendrer la dépendance physique, accompagnée des symptômes de manque suivants : insomnie, agitation, irritabilité, tension musculaire et, dans les cas les plus graves, hallucinations, psychose et attaques.[2,3]

Le test CEDIA Benzodiazépines utilise la technologie de l'ADN recombinant (brevet US n° 4708929) et correspond à une méthode immuno-enzymatique en phase homogène unique.[6] Ce test utilise l'enzyme bactérienne β-galactosidase scindée au préalable en deux fragments inactifs par génie génétique. Ces fragments se réassocient spontanément pour former une enzyme pleinement active qui, lors de la réaction, fragmente un substrat, produisant un changement de coloration que l'on peut mesurer par spectrophotométrie.

La drogue contenue dans l'échantillon entre en compétition avec la drogue conjuguée à un des fragments inactifs de la β-galactosidase pour se fixer sur les sites de liaison des anticorps. Si la drogue est présente dans l'échantillon, elle se fixe sur les anticorps, laissant ainsi les fragments inactifs de l'enzyme former une enzyme active. Si l'échantillon ne contient pas de drogue, les anticorps se lient à la drogue conjuguée du segment inactif, entravant la réassociation des fragments inactifs de β-galactosidase, ce qui empêche la formation d'une enzyme active. La quantité d'enzyme active formée et la variation d'extinction qui en découle sont proportionnelles à la quantité de drogue présente dans l'échantillon.

Afin d'améliorer la sensibilité du test, une enzyme facultative est ajoutée pour hydrolyser les métabolites glycuroconjugués des benzodiazépines, favorisant ainsi le dépistage des échantillons contenant des métabolites des benzodiazépines.[7,8]

Réactifs

1 **Tampon de reconstitution de l'EA:** Contient pipérazine-N, N-bis [2-acide éthanesulfonique]; 13,6 µg/L anti-corps polyclonaux de mouton anti-benzodiazépines; sels tampons, stabilisant; conservateur.
1a **Réactif EA:** Contient 0,171 g/L Enzyme Accepteur ; sels tampons; détergent; conservateur.
2 **Tampon de reconstitution de l'ED:** Contient pipérazine-N,N-bis[2-acide éthanesulfonique]; sels tampons; conservateur.
2a **Réactif ED:** Contient 9,7 µg/L ED marqué à un dérivé de la benzodiazépine; 1,67g/L rouge de chlorophénol-β- galactopyranoside; stabilisant; conservateur.

Matériel supplémentaire: Étiquettes à code-barres de remplacement (pour n° de réf. 100085 et 100094. Se référer à la fiche technique spécifique de l'analyseur pour le mode d'emploi). Flacons vides d'analyseur pour le transvasement des solutions EA/ED (n° de réf. 100094). Flacons vides d'analyseur pour le transvasement des solutions ED (n° de réf. 1775561)

Matériel supplémentaire requis (vendu individuellement) :
Étalon négatif CEDIA
Étalon multi-drogues CEDIA, Seuils primaires ou Seuils cliniques primaires (300 ng/ml)
Étalon multi-drogues CEDIA, Seuils secondaires ou Seuils optionnels (200 ng/ml)
Étalon multi-drogues CEDIA moyen
Étalon multi-drogues CEDIA haut
Groupe de témoins spéciaux ou groupe de témoins optionnels (pour seuil de 200 ng/ml)
Groupe de témoins multi-drogues ou groupe de témoins cliniques (pour seuil de 300 ng/ml)
Réactif β-Glucuronidase (pour test à haute sensibilité)
Code-barres alternatif pour utilisation à haute sensibilité :
Utiliser avec les analyseurs Hitachi 911, 912 et 917

⚠ Avertissements et mises en garde

Les réactifs contiennent de l'azide de sodium. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. En cas de contact, rincer à grande eau. En cas de projection dans l'œil ou d'ingestion, consulter immédiatement un médecin. L'azide de sodium peut réagir dans les conduites de plomb ou de cuivre et former des azides métalliques explosifs. Pour éliminer les réactifs, il est donc nécessaire de rincer abondamment à l'eau afin d'éviter toute accumulation d'azides. Nettoyer les surfaces métalliques exposées avec de la soude caustique à 10 %.

Préparation et conservation des réactifs

Voir les instructions données ci-dessous pour la préparation des solutions pour les analyseurs Hitachi. Pour tous les autres analyseurs, se référer à la fiche technique spécifique à l'analyseur. Sortir le kit du réfrigérateur immédiatement avant la préparation des solutions.

Préparer les solutions dans l'ordre suivant pour minimiser le risque de contamination possible:

R2 Solution Enzyme Donneur : Relier un flacon 2a (Réactif ED) à un flacon 2 (tampon ED) à l'aide d'un des raccords contenus dans le coffret. Dissoudre le contenu du flacon 2a par retournements successifs et verser cette solution dans le flacon 2 sans perte de lyophilisat. Eviter la formation de mousse. Détacher le flacon 2a et le raccord du flacon 2 et les jeter. Fermer le flacon 2 et le laisser reposer à température ambiante (entre 15 et 25°C) env. 5 min. Mélanger de nouveau et noter la date de reconstitution sur l'étiquette.

R1 Solution Enzyme Accepteur: Relier un flacon 1a (Réactif EA) à un flacon 1 (tampon EA) à l'aide d'un des raccords contenus dans le coffret. Dissoudre le contenu du flacon 1a par retournements successifs et verser cette solution dans le flacon 1 sans perte de lyophilisat. Eviter la formation de mousse. Détacher le flacon 1a et le raccord du flacon 1 et les jeter. Fermer le flacon 1 et le laisser reposer à température ambiante (entre 15 et 25°C) env. 5 min. Mélanger de nouveau et noter la date de reconstitution sur l'étiquette.

N° de réf. 100094 - Analyseur Hitachi 717, 911, 912 ou 914 : transvaser les réactifs reconstitués dans les flacons vides correspondants de 100 ml R1 et R2 fournis avec le kit. **Hitachi 917/Modular Analytics P :** utiliser les réactifs reconstitués sans transvaser les flacons. Jeter les flacons de 100 ml vides.
N° de réf. 1775561-Analyseur Hitachi 747/Modular Analytics D : à l'aide de l'entonnoir fourni, transférer une partie de la solution R2 dans le flacon de solution R2 vide fourni et portant l'étiquette correspondante.
Protocole Benzodiazépines haute sensibilité : pour utiliser le réactif β-glucuronidase, ajouter à la solution reconstituée de l'EA 0,09 ml de β-glucuronidase pour le n° de réf. 100085, 0.425 ml pour le n° de réf. 100094, et 2,5 ml pour le n° de réf. 1775561. Mélanger par retournements lents. Noter sur l'étiquette du flacon l'addition du réactif β-glucuronidase.

REMARQUE 1: Les composants de ce kit doivent être utilisés ensemble. Ne jamais mélanger les réactifs de différents coffrets.
REMARQUE 2: veiller à ne pas intervertir les bouchons des flacons de réactifs pour éviter toute contamination croisée des réactifs. La solution R2 doit être jaune orangé. Une coloration rouge sombre ou rouge violacé signifie que le réactif est contaminé et doit être éliminé.
REMARQUE 3: les solutions R1 et R2 doivent être amenées à la température du compartiment de stockage de l'analyseur avant de procéder au test. Se référer à la fiche technique spécifique de l'analyseur pour toute information complémentaire.
REMARQUE 4: Pour assurer la stabilité de la solution EA reconstituée, ne pas l'exposer de façon prolongée ou continue à une forte lumière.

Stocker les réactifs entre 2 et 8 °C. **NE PAS CONGELER.** Pour la stabilité des composants non ouverts, se référer à la date de péremption figurant sur l'étiquetage de la boîte ou des flacons.

Solution R1: 60 jours réfrigérée dans l'analyseur ou entre 2 et 8 °C.
Solution R2: 60 jours réfrigérée dans l'analyseur ou entre 2 et 8 °C.

Prélèvement et manipulation des échantillons

Recueillir les échantillons d'urine dans des récipients propres en verre ou en plastique. Centrifuger les échantillons présentant une forte turbidité avant de les analyser. Tout échantillon d'urine humaine doit être manipulé comme étant potentiellement infectieux. Recueillir et tester un nouvel échantillon si on soupçonne une adultération de l'échantillon d'origine. L'adultération des échantillons d'urine peut affecter les résultats du test.

Tout échantillon qui n'est pas initialement testé dans les 7 jours suivant son arrivée au laboratoire doit être conservé dans un réfrigérateur en milieu fermé, conformément aux *The Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs ; Final Guidelines ; Notice.*[9]

Procédure du test

Pour réaliser ce test, on peut utiliser un analyseur chimique capable de maintenir une température constante, de prélever des échantillons à la pipette, de mélanger des réactifs, de mesurer des taux enzymatiques et d'assurer le minutage de la réaction. Les fiches techniques avec les paramètres spécifiques des instruments sont disponibles auprès de Microgenics, une division de Thermo Fisher Scientific.

Des étiquettes à code-barres supplémentaires sont fournies pour une détermination semi-quantitative avec les kits de 17 et de 65 ml seulement. Pour les utiliser, recouvrir l'étiquette de chaque flacon de celle qui convient.

Contrôle de qualité et calibration[10]

Analyse qualitative

Pour réaliser une **analyse d'échantillons qualitative**, utiliser l'étalon multi-drogues, Seuils primaires, Seuils cliniques primaires, Seuils optionnels ou Seuils secondaires CEDIA (en fonction des seuils choisis) pour analyser les résultats. (Pour obtenir des résultats haute sensibilité, utiliser seulement le Seuil secondaire.) Se référer à la fiche technique spécifique de chaque appareil.

Analyse semi-quantitative

Pour réaliser une **analyse d'échantillons semi-quantitative**, utiliser l'étalon multi-drogues, Seuils primaires, Seuils cliniques primaires, Seuils secondaires ou Seuils optionnels CEDIA (en fonction des seuils choisis) en conjonction avec l'étalon négatif et les étalons multi-drogues moyen et haut pour analyser les résultats. Se référer à la fiche technique spécifique de chaque appareil.

Il est important de prévoir la vérification quotidienne des échantillons de patients et de l'étalonnage effectué à l'aide d'échantillons de contrôle. Il est recommandé d'effectuer deux contrôles de qualité : l'un de 25 % supérieur au seuil sélectionné, l'autre de 25 % inférieur au seuil sélectionné. Utiliser le groupe de témoins multi-drogues ou le groupe de témoins cliniques multi-drogues (seuil de 300 ng), le groupe de témoins spéciaux ou le groupe de témoins optionnels (seuil de 200 ng) CEDIA pour le contrôle qualité. L'appareil doit être recalibré à chaque changement de réactifs et en cas d'écart dans les valeurs de contrôle. La fréquence des contrôles doit être déterminée par le laboratoire. L'évaluation du contrôle qualité doit se baser sur les valeurs obtenues par les témoins, elles doivent se situer dans les limites spécifiées. En cas de détection d'une tendance à la hausse ou à la baisse ou de décalages soudains, vérifier tous les paramètres de fonctionnement. Pour plus de renseignements, s'adresser au service technique Microgenics, une division de Thermo Fisher Scientific. Toutes les exigences de contrôle qualité doivent être appliquées conformément aux règlements locaux, régionaux et nationaux ou aux conditions d'agrément.

Résultats et valeurs théoriques

Résultats qualitatifs

Les étalons multi-drogues, Seuils primaires, Seuils cliniques primaires, Seuils secondaires ou Seuils optionnels CEDIA servent de référence pour différencier les échantillons positifs des échantillons négatifs. Les échantillons générant une réponse dont la valeur est égale ou supérieure à celle de l'étalon sont considérés comme positifs. Les échantillons dont le résultat est inférieur à celui de l'étalon sont considérés comme négatifs. Se référer à la fiche technique spécifique de l'analyseur pour toute information complémentaire.

Résultats semi-quantitatifs

L'étalon multi-drogues, Seuils primaires, Seuils cliniques primaires, Seuils secondaires ou Seuils optionnels CEDIA, utilisé en conjonction avec l'étalon négatif et les étalons multi-drogues moyen et haut, peut être utilisé pour estimer la concentration relative de benzodiazépines.

Les résultats de concentration doivent être rapportés avec prudence car de nombreux autres facteurs sont susceptibles de fausser les résultats d'un test urinaire, tels que l'apport hydrique et autres facteurs biologiques.

Limitations

1. Un résultat positif indique la présence de benzodiazépines mais ne peut reconnaître ni mesurer une intoxication.
2. La présence dans l'échantillon d'autres substances non énumérées de même que les erreurs techniques ou de manipulations peuvent conduire à des résultats erronés.

Performances spécifiques

Les données de performances typiques obtenues sur l'appareil Hitachi 717 sont indiquées ci-dessous.11 Les données obtenues peuvent varier d'un laboratoire à un autre.

Précision

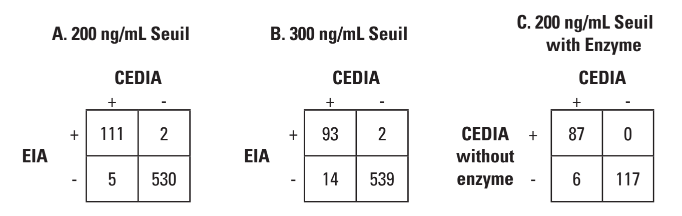
L'étude suivante a été menée sans ajouter le réactif β-glucuronidase. Les données sont représentatives des deux applications.

Des études mesurant la précision à l'aide de réactifs et de calibrateurs fournis dans le coffret, ont donné les résultats suivants en mA/min avec un analyseur Hitachi 717 en observant les directives d'une expérience de réplication modifiée NCCLS (6 exemplaires deux fois par jour pendant 10 jours) :

	Précision dans la série				Précision totale			
ng/mL	200	225	300	375	200	225	300	375
n	120	120	120	120	120	120	120	120
$\bar{x}$	324,3	340,6	366,1	402,0	324,3	340,6	366,1	402,0
SD	2,4	2,7	2,8	3,7	11,4	12,5	13,2	14,6
CV	0,8%	0,8%	0,8%	0,9%	3,5%	3,7%	3,6%	3,6%

Exactitude

648 échantillons d'urine ont été testés avec le test CEDIA Benzodiazépines sur l'analyseur Hitachi 717 par la méthode EIA à titre de référence (A et B). Deux cents échantillons supplémentaires et dix échantillons de contenu artificiellement élevé (avec du nitrazépam jusqu'à une gamme dans les + 25 % du seuil de 200 dans de l'urine négative) ont été testés avec et sans l'addition de l'enzyme b-glucuronidase sur l'analyseur Hitachi 717 (C). Les résultats suivants ont été obtenus :[11]



A. 200 ng/mL Seuil

		CEDIA +	CEDIA -
EIA	+	111	2
EIA	-	5	530

B. 300 ng/mL Seuil

		CEDIA +	CEDIA -
EIA	+	93	2
EIA	-	14	539

C. 200 ng/mL Seuil with Enzyme

		CEDIA +	CEDIA -
CEDIA without enzyme	+	87	0
CEDIA without enzyme	-	6	117

Spécificité

Les composés parents et les métabolites suivants ont été testés avec le test CEDIA Benzodiazépines (sans β-Glucuronidase), et avec le test haute sensibilité (avec β-Glucuronidase). Les pourcentages de réactions croisées suivants ont été obtenus:

Composés	Sans β-Glucuronidase		Avec β-Glucuronidase	
	Testées (ng/mL)	%Réaction croisées	Testées (ng/mL)	%Réaction croisées
7-NH_2-Flunitrazépam	-	-	200	99
7-NH_2-Nitrazépam	-	-	250	83
α-OH-Alprazolam	163	188	115	167
α-OH-Triazolam	150	193	125	155
Alprazolam	138	205	100	220
Bromazépam	300	110	190	104
Chlordiazepoxyde	2083	13	1200	16
Clobazam	400	62	300	59
Clonazépam	188	140	225	71
Clorazépate	325	84	300	75
Délorazepam	150	184	100	197
Démoxépam	1900	14	1000	19
Désalkylflurazépam	138	210	115	173
Diazépam	110	247	125	154
Estazolam	125	220	95	239
Flunitrazepam	188	135	175	109
Flurazépam	150	189	100	195
Glucronide de alprazolam	-	-	200	100
Glucronide de lorazépam	10000	1	400	45
Glucronide de oxazépam	10000	1	800	25
Glucronide de témazépam	10000	1	750	25
Halazépam	200	145	200	101
Lorazépam	208	122	175	115
Lormetazépam	163	165	150	137
Médazépam	200	135	150	118
NH_2-Clonazépam	-	-	200	96
Nitrazépam	300	100	200	100
Nordiazépam	150	211	120	173
Oxaprozin	10000	2	10000	2
Oxazépam	275	107	165	125
Prazépam	150	184	160	116
Témazépam	175	144	180	93
Triazolam	138	191	90	217

Des composés non apparentés par leur structure ont été soumis au test CEDIA Benzodiazépine, en utilisant un protocole de seuil de 300 ng/mL et ont donné un résultat négatif lorsqu'ils ont été soumis aux concentrations ci-dessous. On observe la même performance en utilisant le protocole de seuil haute sensibilité de 200 ng/mL.

Composé	ng/mL	Composé	ng/mL
11-nor-Δ^9-THC-COOH	10.000	Ibuprofène	500.000
Acétaminophéne	500.000	Lévothyroxine	50.000
Acide acétylsalicylique	500.000	Méthadone	100.000
Acide salicylurique	100.000	Méthamphetamine	500.000
Amoxicilline	100.000	Morphine	100.000
Amphétamine	500.000	Nifédipine	500.000
Benzoylecgonine	500.000	Phencyclidine	250.000
Captopril	500.000	Phénobarbital	500.000
Cimetidine	500.000	Propoxyphéne	500.000
Codéine	500.000	Ranitidine	500.000
Digoxine	100.000	Sécobarbital	500.000
EDDP	500.000	Sertraline	250.000
EMDP	100.000	Tolmétin	500.000
Enalapril	500.000	Vérapamil	500.000
Fluoxétine	500.000		

Aucune interférence n'a été observée lorsque les substances suivantes ont été ajoutées aux concentrations endogènes normales trouvées dans les urines soumises au test CEDIA Benzodiazépines :

Composé	Concentration	Composé	Concentration
Acétone	$\leq$ 1,0 g/dL	γ–globuline	$\leq$ 0,5 g/dL
Acide ascorbique	$\leq$ 0,15 g/dL	Glucose	$\leq$ 3,0 g/dL
Acide oxalique	$\leq$ 0,1 g/dL	Hémoglobine	$\leq$ 0,3 g/dL
Chlorure de sodium	$\leq$ 6,0 g/dL	Riboflavine	$\leq$ 7,5 mg/dL
Créatinine	$\leq$ 0,5 g/dL	Seralbumine humaine	$\leq$ 0,5 g/dL
Éthanol	$\leq$ 1,0 g/dL	Urée	$\leq$ 6,0 g/dL
Galactose	$\leq$ 10 mg/dL		

Sensibilité

Application Standard

Pour l'analyse qualitative, la limite de détection (LOD), définie à 3 s de 21 exemplaires du calibrateur négatif, se situait à 10,8 ng/mL et à 12,8 ng/mL pour les protocoles de seuil de 200 ng/ml et 300 ng/mL respectivement.

Pour l'analyse semi-quantitative, la limite de détection (LOD), définie à 3 s de 21 exemplaires du calibrateur négatif, se situait à 6,4 ng/mL et á 8,3 ng/mL pour les protocoles de seuil de 200 ng/mL et 300 ng/mL respectivement.

Application de Haute sensibilité

Pour l'analyse qualitative, la limite de détection (LOD), définie à 3 s de 21 exemplaires du calibrateur négatif, se situait à 12,3 ng/mL pour le protocole de seuil de 200 ng/mL.

Pour l'analyse semi-quantitative, la limite de détection (LOD), définie à 3 s de 21 exemplaires du calibrateur négatif, se situait à 7,3 ng/mL pour le protocole de seuil de 200 ng/mL.

Bibliographie

1. Hawks RL. Analytical methodology. In: Hawks RL, Chiang CN, eds. Urine testing for drugs of abuse. NIDA Research Monograph. 1986; 73: 30-41.
2. Katzung BG, ed. Basic and clinical pharmacology. 5th ed. Norwalk, Conn: Appleton & Lange, 1992.
3. Julien RM.. A primer of drug action. 6th ed. New York, NY: W.H. Freeman & Co; 1992.
4. Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York, NY: Pergamon Press, 1990.
5. Adams EH. Prevalence of prescription drug abuse: Data from the National Institute on Drug Abuse. NY State J Med 199; 91 (suppl 11): 32s-36s.
6. Henderson DR, Friedman SB, Harris JD et al. CEDIA™, a new homogeneous immunoassay system. Clin Chem. 1986; 32: 1637-1641.
7. Beck O, Lafolle P, Hjemdahl P et al. Detection of Benzodiazepine Intake in Therapeutic Doses by Immunoanalysis of Urine: Two Techniques Evaluated and Modified for Improved Performance. Clin Chem. 1992; 38: 271-275
8. Simonsson P, Liden A, Lindberg S. Effect of a-Glucuronidase on Urinary Benzodiazepine Concentrations Determined by Flourescence Polarization Immunossay. Clin Chem. 1995; 41: 920-923
9. Notice of Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Program: Final guidelines. Federal Register. 1994; 110 (June 9): 11983. (Revised Guidelines expected in 2002).
10. Data on traceability are on file at Microgenics Corporation, une division de Thermo Fisher Scientific.
11 Données deposées auprès de Microgenics Corporation, une division de Thermo Fisher Scientific.



Microgenics Corporation
46360 Fremont Blvd.
Fremont, CA 94538-6406 États-Unis
Soutien client et technique
aux États-Unis :
1-800-232-3342



EC REP

Thermo Fisher Scientific Oy
Ratastie 2, P.O. Box 100
01621 Vantaa, Finland
Tel: +358-9-329100
Fax: +358-9-32910300



Pour des mises à jour de la notice, consulter:
www.thermoscientific.com/diagnostics

Autres pays:
Contacter le représentant local Thermo Fisher Scientific.

10006458-2_FR
2012 07

